

# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

С.И. Марченко, Т.В. Трухачева\*, П.Т. Петров\*, А.И. Жебентяев

## СТАБИЛЬНОСТЬ ЦИТОЗИНАРАБИНОЗИДА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Витебский государственный медицинский университет

\*Научно-фармацевтический центр РУП «Белмедпрепараты»

*Изучена стабильность цитозинарабинозида в водных растворах различного состава при хранении при температурах 4 °С, 25 °С, 40 °С, а также влияния дополнительных ингредиентов на качественный и количественный состав лекарственной формы с течением времени. Контроль количественного содержания цитозинарабинозида и его примесей осуществлялся методом ВЭЖХ. Рассчитаны кинетические параметры реакции распада цитозинарабинозида и образования урациларабинозида.*

### ВВЕДЕНИЕ

Цитарабин (Cytarabine) относится к группе антиметаболитов, антагонистов пиримидина. Наиболее эффективен при остром миелобластном лейкозе у детей и взрослых, эритролейкозе, неходжкинской лимфоме [2]. Цитарабин вводят в виде раствора внутривенно (капельно или инфузионно), подкожно или интратекально. 90% лекарственного вещества выводится с мочой в виде неактивного урациларабинозида [3].

Большинство фирм выпускают препарат цитарабин в виде сухого (лиофилизированного) порошка для инъекций (Цитарабин «РУП Белмедпрепараты», Цитарабин-ЛЭНС «ООО ЛЭНС-Фарм», Cytarabine «Grindex», Cytonal «CTS Chemical Industries Ltd» и др.). В то же время, был зарегистрирован цитарабин в виде раствора инъекций (Cytarabine «Therabel Pharma S.A.»).

Производство инъекционной лекарственной формы цитарабина в виде лиофилизированного порошка является весьма сложным и дорогостоящим процессом, но хранение лекарственного средства в сухом виде позволяет надежно обеспечить его стабильность. Для приготовления раствора лекарственного средства из лиофилизированного порошка используют физиологический раствор, растворы Рингера, Элиота Б, а также 5% раствор глюкозы либо декстрозы [3, 8]. Создание и производство стабильной лекарственной формы цитозинарабинозида в виде раствора является и по сей день актуальной задачей фармацевтической промышленности.

На рис. 1 приведена схема гидролитического дезаминирования цитозинарабинозида (1) с образованием урациларабинозида (2).

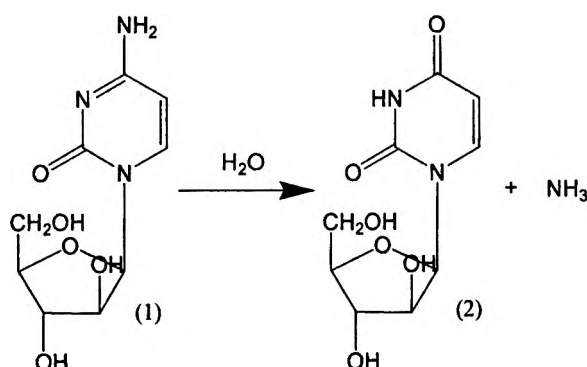


Рис. 1. Схема гидролитического дезаминирования цитозинарабинозида (1 – цитозинарабинозид, 2 – урациларабинозид).

Стабильность растворов цитарабина (цитозинарабинозида, ара-Ц) изучалась для различных концентраций (0,05-100 мг/мл), при различных температурных режимах (8-70°C), с использованием различных растворителей (0,9% раствор NaCl, 0,5% раствор декстрозы, растворы Рингера, Элиота Б, гидрокарбоната натрия), различными методами (высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), спектрофотометрии (СФМ)). Длительность хранения составляла от 1 до 28 суток в емкостях из различного материала (таблица 1).

Таблица 1

## Изучение стабильности раствора цитозинарабинозида

Концентрация, мг/мл	Материал	Температура, °C	Растворитель	Время, сут.	Метод анализа	Результат	Литература
100	Пластик	25	0,9% NaCl, Рингера, Элиота Б, 0,5% декстроза	1	ВЭЖХ	+	8
0,05	—	8; 25	0,9% NaCl	2	ВЭЖХ	+	13
20, 50	Пластик	8; 25	50mEq/L NaHCO <sub>3</sub>	7	ВЭЖХ	+	11
0,267	—	25	5% декстроза	3	СФМ, ВЭЖХ	+	16
25, 1,25	Винил-ацетат	4; 22; 35	0,9% NaCl и 0,5% декстроза	28 7	ВЭЖХ	+	15
20	Стекло	70	вода	25	ВЭЖХ, СФМ	-	4

Максимальный срок экспериментального исследования стабильности при хранении составил 28 суток при 4°C и 22°C, в качестве растворителей в этом случае использовали 0,9% раствор хлорида натрия и 0,5% раствор декстрозы. После хранения раствор удовлетворял требованиям фармакопейных статей, в качестве критерия стабильности использовали концентрацию цитозинарабинозида и урациларабинозида [15]. В работе [4] исследовали кинетику разложения цитозинарабинозида при 70°C в течение 25 суток. Однако работ, посвященных более длительному хранению растворов цитарабина, в доступной литературе не было обнаружено. Следовательно, изучение стабильности растворов цитозинарабинозида в течение года и более (при различных температурах) является актуальной задачей для разработки оптимального состава и определения сроков годности лекарственной формы цитарабина в виде раствора для инъекций.

Требованиями государственных фармакопей регламентируется определение в 2% растворе цитарабина действующего вещества – 95-105% [7], 90-110% [18]; примеси урациларабинозида – 2% от количества цитозинарабинозида [7, 18], других посторонних примесей – 0,5% [7, 18].

Для проверки качества лекарственных средств цитозинарабинозида (ара-Ц), в основном применяется метод ВЭЖХ. В литературе описан ряд методик ВЭЖХ определения цитозинарабинозида и его метаболитов: ион-парной хроматографии [5, 14, 17], ионообменной хроматографии [12, 19]. В последнее время для определения арабинозилнуклеозидов чаще всего используется ВЭЖХ с обращенными фазами (ОФ ВЭЖХ) [6, 9, 10], которая имеет ряд преимуществ [4] перед другими методами. В связи с этим, в работе использовали метод ОФ ВЭЖХ.

Целью данной работы является изучение стабильности цитозинарабинозида при его хранении в водных растворах различного состава при температурах 4°C, 25°C, 40°C, а также влияния дополнительных ингредиентов на качественный и количественный состав продукта с течением времени.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован хроматограф фирмы Shimadzu (Япония) (SPD-10A – UV-VIS детектор с переменной длиной волны, CBM-10A – блок управления, LC-10AT – насос высокого давления, FCV-10AL – градиентный насос, GT-104 – дегазатор), дозирующая петля на 20 мкл.

Для хроматографического разделения использована колонка Baker Octadecyl (250 мм × 4,6 мм × 5 мкм), скорость потока подвижной фазы 1,8 мл/мин.

В качестве подвижной фазы использована смесь 0,06 М раствора натрия гидрофосфата и 0,05 М раствора калия дигидрофосфата (5:3) (рН 7,0±0,1).

Детектирование проводили при длине волны 260 нм.

Колонку промывали подвижной фазой в течение 120 минут со скоростью 1 мл/мин.

В качестве объекта исследования были приготовлены экспериментальные 2% растворы цитозинарабинозида:

Раствор 1 — 2,0 г цитозинарабинозида, 100 мл воды для инъекций.

Раствор 2 — 2,0 г цитозинарабинозида, 0,9 г хлорида натрия, 100 мл воды для инъекций.

Раствор 3 — 2,0 г цитозинарабинозида, 0,6 г хлорида натрия, 0,5 мл 50% раствора лактата натрия, воды для инъекций до 100 мл.

Раствор 4 — 2,0 г цитозинарабинозида, 2,0 г поливинилпирролидона (ПВП) (Мм. 12600), воды для инъекций до 100 мл.

Вспомогательные вещества: натрия хлорид, натрия лактат, ПВП – фармакопейного качества.

Все растворы были разлиты в ампулы (ISO 9187 C-5-cl) по 5 мл и запаяны в токе азота. Ампулы заложили на хранение при температуре 4°C, 25°C и 40°C.

Растворы хранились при 40°C 276 дней, что соответствует 3 годам хранения при комнатной температуре (Согласно Временной инструкции И-42-2-82). При 4 и 25°C хранение составило 24 месяца. Анализ раствора, находящегося при 40°C, осуществлялся через 46 дней (~6 месяцев хранения при температуре 25°C), при 4 и 25°C – каждые 3 месяца.

Количественное содержание цитозинарабинозида и его примесей проводили методом ОФ ВЭЖХ. Концентрацию цитозинарабинозида рассчитывали по формуле 1:

$$\% = \frac{S \cdot m_{\text{PCO}} \cdot R \cdot 100}{S_{\text{PCO}}} \quad (1),$$

где S – площадь пика в анализируемом образце,  $S_{\text{PCO}}$  – площадь пика PCO, R – разведение.

Концентрацию урациларабинозида (ара-У) рассчитывали по формуле 2:

$$\% = \frac{S_{\text{ара-У}} \cdot 100}{S_{\text{ара-Ц}} \cdot k} \quad (2),$$

где  $S_{\text{ара-Ц}}$  – площадь пика ара-Ц в анализируемом образце,  $S_{\text{ара-У}}$  – площадь пика урациларабинозида, k – экспериментально рассчитанный коэффициент, равный 1,254.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты обработали и привели в виде графиков. На рис. 2 представлены результаты по хранению растворов при 40°C, на рис. 3 – при 25°C, на рис. 4 – при 4°C.

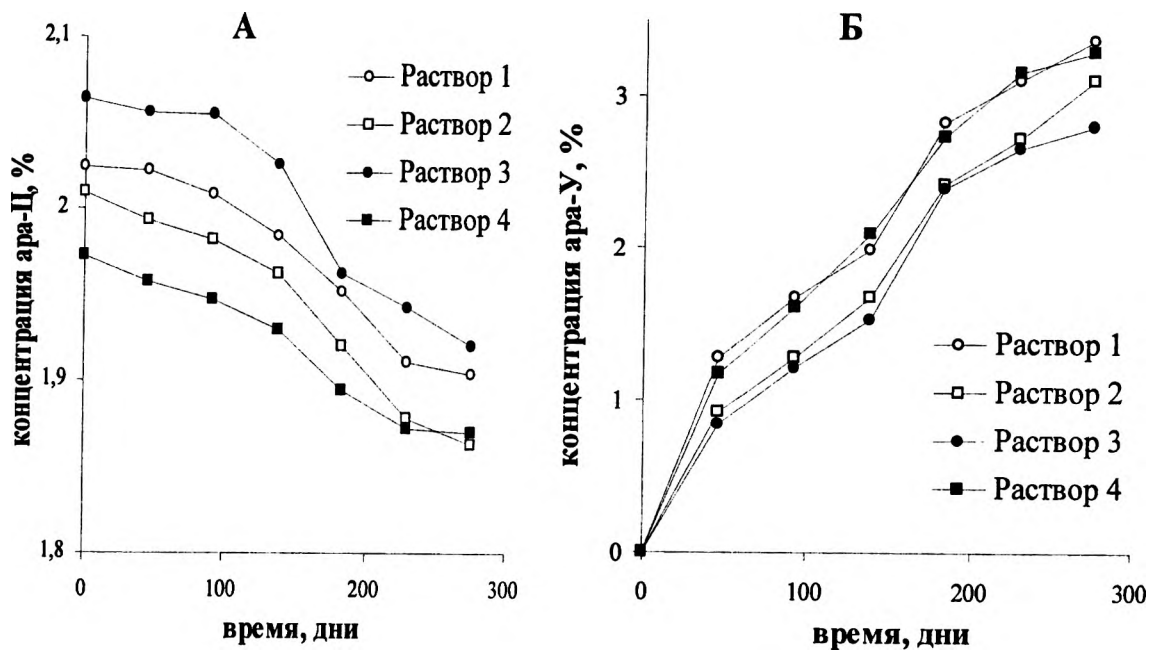


Рис. 2. Концентрация цитозинарабинозида (А) и урациларабинозида (Б) в растворах, хранившихся при 40°C.

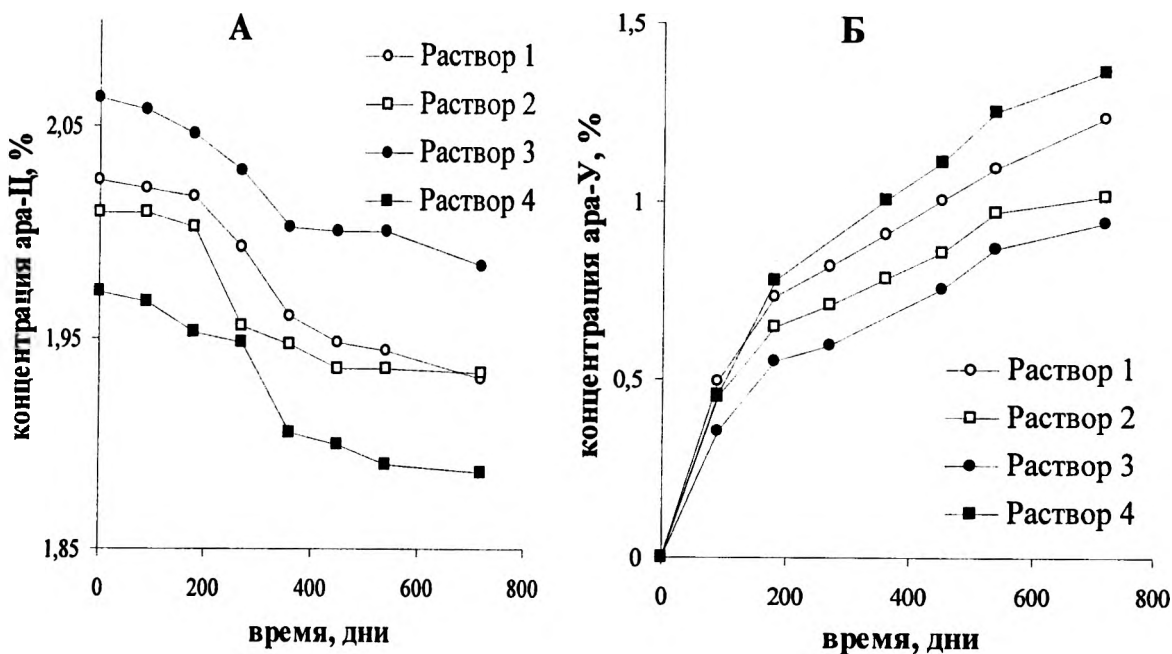


Рис. 3. Концентрация цитозинарабинозида (А) и урациларабинозида (Б) в растворах, хранившихся при 25°C.

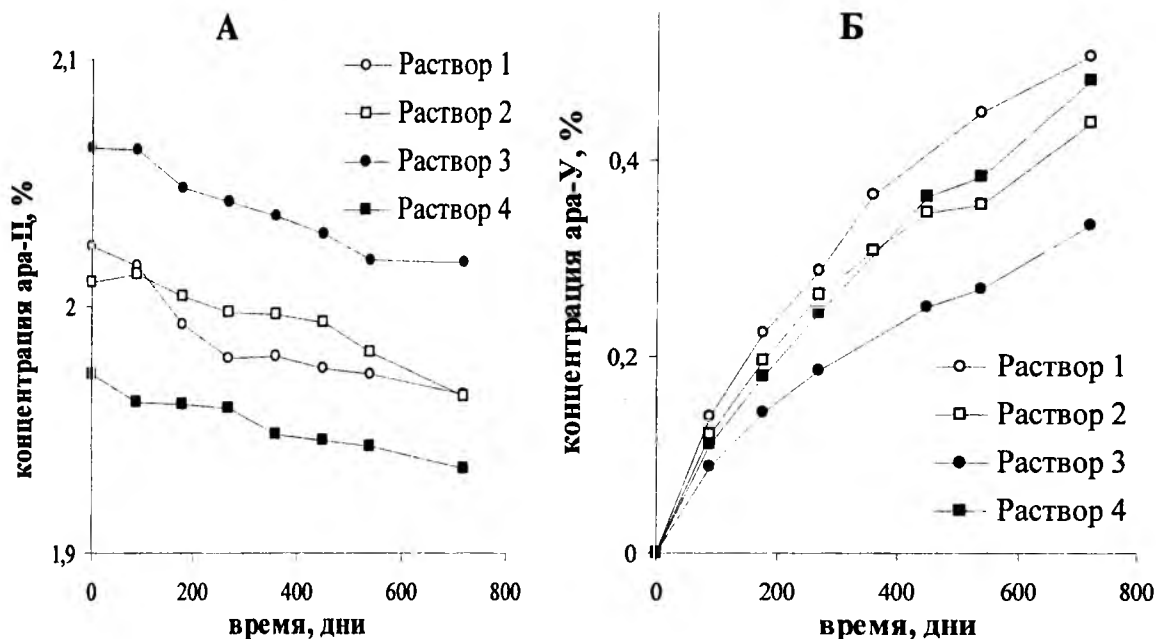


Рис. 4. Концентрация цитозинарабинозида (А) и урациларабинозида (Б) в растворах, хранившихся при 4°C.

Согласно полученным данным, содержание основного компонента осталось в норме для всех случаев (согласно [18] – 110%), а содержание урациларабинозида превысило допустимую норму (согласно [7, 18] – до 2%) в случае ускоренного хранения при температуре 40°C через 138 дней (18 месяцев расчетного времени хранения при 25°C) концентрация урациларабинозида составила около 2%, в то же время, при хранении при 25°C она составила в среднем 1%. Таким образом, методика ускоренного хранения, согласно Временной инструкции И-42-2-82, при 40°C не может быть использована для оценки сроков хранения растворов цитарабина. Для растворов, хранившихся при 4°C, характерно стабильное содержание цитозинарабинозида и незначительный рост содержания примеси урациларабинозида (максимально – 0,50% (в растворе 1)). Метрологические характеристики результатов определения ара-Ц и ара-У по предложенной методике представлены в таблице 2.

Таблица 2  
Метрологические характеристики результатов определения ара-Ц и ара-У

Объект\Характеристики	$X_{\text{сред}}, \%$	n	S	$\Delta X$	RSD%
Цитозинарабинозид	1,99	6	0,0067	$\pm 0,02$	0,34
Урациларабинозид*	2,18	6	0,0289	$\pm 0,08$	1,33

\* – % содержание от определенного количества ара-Ц в растворе

В этой таблице n – число параллельных определений. Расчеты, представленные в таблице 2, выполнены для доверительной вероятности  $P=0,95$ . Стандартное отклонение (S) и полуширину доверительного интервала ( $\Delta X$ ) вычисляли, как описано в [1], относительное стандартное отклонение (RSD%) – [7]. Метрологические характеристики результатов определения свидетельствует о хорошей воспроизводимости методики.

Для полученных экспериментальных данных было рассчитано, что реакции гидролитического дезаминирования и дальнейшего распада ара-Ц и образования ара-У являются реакциями первого порядка, что согласуется с литературными данными [4].

По полученным данным были рассчитаны константы скоростей реакций распада ара-Ц ( $k_1$ ) и образования ара-У ( $k_2$ ), а также их коэффициенты корреляции ( $r_1$  и  $r_2$ ). Константы вычислялись аппроксимацией по методу наименьших квадратов к уравнению 3 вида:

$$\ln C = -k \cdot t \quad (3),$$

где  $C$  – текущая концентрация, выраженная в долях по отношению к начальной концентрации,  $t$  – время хранения растворов (ч),  $k$  – константа скорости реакции.

Кинетические параметры хранения растворов приведены в таблице 3. Для растворов, хранившихся при 4°C, в связи с незначительной степенью дезаминирования цитозинарабинозида, расчет кинетических параметров реакции не производили.

Таблица 3

Константы скоростей реакций распада цитозинарабинозида ( $k_1$ ) и образования урациларабинозида ( $k_2$ ) при температурах 25°C, 40°C и их коэффициенты корреляции  $r_1$  и  $r_2$  – соответственно

Растворы	1		2		3		4	
Температура, °C	25	40	25	40	25	40	25	40
$k_1 \times 10^5$ (ч <sup>-1</sup> )	0,316	0,884	0,320	1,080	0,274	1,007	0,326	0,83
$r_1$	0,95	0,95	0,94	0,97	0,96	0,94	0,96	0,9
$k_2 \times 10^4$ (ч <sup>-1</sup> )	0,798	1,843	0,751	2,319	0,925	2,415	1,074	2,09
$r_2$	0,88	0,97	0,90	0,97	0,88	0,95	0,77	0,9

Из данных, приведенных в таблице 3, видно, что при 40°C скорости реакций распада ара-Ц и образования ара-У выше в присутствии натрия хлорида и натрия лактата (растворы 2 и 3), присутствие ПВП (раствор 4) замедляет скорость распада ара-Ц. При температуре 25°C концентрация основного вещества лучше сохраняется в растворе, содержащем лактат и хлорид натрия (раствор 3), а скорость образования ара-У меньше в растворе без дополнительных компонентов (раствор 1). Все вышеперечисленные различия незначительны, так как константы скоростей близки и итоговое содержание цитарабина хорошо укладывается в нормы [7, 18].

### ВЫВОДЫ

Изучена стабильность лекарственной формы цитарабина в виде раствора для инъекций различного состава при температуре 4°C, 25°C в течение 24 месяцев, при температуре 40°C – 276 суток (теоретически 36 месяцев). Полученные результаты свидетельствуют о большей устойчивости цитозинарабинозида к гидролитическому дезаминированию в водных растворах, чем считалось ранее. Методика ускоренного хранения при 40°C не может быть использована для оценки сроков хранения растворов цитарабина, так как дает завышенные результаты по содержанию примеси. Анализ растворов, хранившихся при 4°C и 25°C, показывает возможность их хранения и безопасного использования в течение 2 лет, поэтому создание готовой лекарственной формы в виде раствора является весьма перспективным. Рекомендуемый состав лекарственной формы – 2% раствор цитарабина, изотонированный хлоридом натрия, так как он является наиболее физиологичным.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР XI, Вып. 1. – М.: Медицина, 1987. – 336с.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. Т. 2. – 14-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2002. – 608 с.
3. Михайлов И.Б. Основы рациональной фармакотерапии. – С.-Пб: Фолиант, 1999. – 352 с.

4. Смирнов И.В., Завьялов Г.Г., Еремин С.В. Сравнение методов исследования кинетики реакции гидролитического дезаминирования цитарабина в водных растворах // Хим.-фарм. журнал. – 2000. – Т. 34, №8. – С. 53-56.
5. Braess J., Pfortner J., Kaufmann C.C. et al. Detection and determination of the major metabolites of [3H]cytosine arabinoside by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B Biomed. Appl. – 1996. – Vol. 676, №1. – P. 131-140.
6. Fahmy O.T., Korany M.A., Maher H.M. High performance liquid chromatographic determination of some co-administered anticancer drugs in pharmaceutical preparations and in spiked human plasma // J. Pharm. And Biomed. Anal. – 2004. – Vol. 34. – 1099-1107.
7. British Pharmacopoeia 2002. Version 6.0. Crown Copyright 2002.
8. Cheung Y.W., Vishnuvajjala B.R., Flora K.P. Stability of cytarabine, methotrexate sodium, and hydrocortisone sodium succinate admixtures // Am. J. Hosp. Pharm. – 1984. – Vol. 41, №9, P. 1802-1806.
9. Dietrich P.G., Buechele B., Molnar I. Determination of cytarabine by HPLC // Pharmazie. – 1992. – Vol. 47, №11. – P. 868-869.
10. Kissinger L.D., Stemm N.L. Determination of the antileukemia agents cytarabine and azacitidine and their respective degradation products by high- performance liquid chromatography // J. Chromatogr. – 1986. – Vol. 353. – P. 309-318.
11. Munson J.W., Kubiak E.J., Cohon M.S. Cytosine arabinoside stability in intravenous admixtures with sodium bicarbonate and in plastic syringes // Drug. Intell. Clin. Pharm. – 1982. – Vol. 16, №10. – P. 765-767.
12. Pallavicini M.G., Mazrimas J.A. High-performance liquid-chromatographic analysis of cytosine arabinoside [cytarabine] and metabolites in biological samples // J. Chromatogr. – 1980. – Vol. 183, №4. – P. 449-458.
13. Quock J.R., Sakai R.I. Stability of cytarabine in a parenteral nutrient solution // Am. J. Hosp. Pharm. – 1985. – Vol. 42, №3, P. 592-594.
14. Ramsauer B., Braess J., Unterhalt M. et al. Highly sensitive high-performance liquid chromatographic assay for 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-5'-stearyl phosphate (cytarabine-ocfosfate) // J. Chromatogr. B Biomed. Appl. – 1995. – Vol. 665, №1. – P. 183-192.
15. Rochard E.B., Barthes D.M., Courtois P.Y. Stability of fluorouracil, cytarabine, or doxorubicin hydrochloride in ethylene vinylacetate portable infusion-pump reservoirs // Am. J. Hosp. Pharm. – 1992. – Vol. 49, №3. – P. 619-623.
16. Seargeant L.E., Kobrinsky N.L., Sus C.J. et al. In vitro stability and compatibility of daunorubicin, cytarabine, and etoposide // Cancer. Treat. Rep. – 1987. – Vol. 71, №12. – P. 1189-1192.
17. Stout M.L., Ravindranath Y. Alkylsulphonic acid ion pairing with radial compression columns for determining plasma or cerebrospinal fluid 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in pediatric pharmacokinetic analysis // J. Chromatogr. A. – 1995. – Vol. 692, №1-2. – P. 59-66.
18. USP 26 - NF 21. 2003 The United States Pharmacopeial Convention, Inc.
19. Wang L.M., Woodward C.N., White J.C., Capizzi R.L. Determination of 3H-labelled cytosine arabinoside and eight metabolites in cell extracts by high-performance liquid chromatography and scintillation spectrometry // J. Chromatogr. – 1989. – Vol. 491, №2. – P. 331-340.

#### SUMMARY

*S.I. Marchenko, T.V. Trukhacheva, P.T. Petrov, A.I. Zhebentyaev*

#### STABILITY OF CYTOSINE ARABINOSIDE IN WATER SOLUTIONS

Stability of cytosine arabinoside in different composition of water solutions under 4°C, 25°C and 40°C and influence of additional ingredients to quality and quantitative composition of the pharmaceutical preparation with time was established. Quantitative control of cytarabine and its impurities was carried out with HPLC. Kinetic parameters of cytarabine decomposition reaction and uracil arabinoside formation reaction were calculated.